

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UND FLUORESZENZ-
SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN
ANTIMITOCHONDRIALEN ANTIKÖRPERN**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Gabriele Will
aus Mainz
Mainz 1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552622_0044

Gesamtherstellung

Blasaditsch GmbH • 89 Augsburg 17 • Theodor-Heuß-Platz 3 • Telefon (0821) 51 85 63

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vergleichende serologische und fluoreszenz-
serologische Untersuchungen an antimitochondrialen
Antikörpern

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

den Medizinischen Fachbereichen
vorgelegt von

Gabriele Will
aus Mainz

Mainz 1978



Fachbereichsdekan: Prof. Dr. med. E. Straub

1. Gutachter: Prof. Dr. vet. Dr. med. K.H. Meyer zum
Büschensfelde

2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Arnold

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	6
A. Patienten	6
B. Methoden	6
1. Fluoreszenzhistologie	6
1.1 Gewinnung von FITC-markiertem IgG	6
1.1.1 IgG-Isolierung	7
1.1.2 Kopplung mit FITC	7
1.1.3 Reinigung des Fluoreszenzkonjugates	7
1.2 Isolierung von IgM	8
1.2.1 Ammoniumsulfatfällung	8
1.2.2 Chromatographische Abtrennung	8
1.3 Direkter FITC-Test oder Monolayer	9
1.4 Indirekter FITC-Test oder Sandwich-Technik	9
2. Serologische Untersuchungen	10
2.1 Gewinnung von Mitochondrien-Antigenen aus Ratten- und menschlicher Leber	10
2.1.1 Differenzierte Ultrazentrifugation	10
2.1.2 Reinigung über Succrose-Gradienten	11
2.2 Komplementbindungsreaktion zum Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern	11
2.3 Komplementbindungsreaktion mit Cardiolipin	12

	Seite
III. Ergebnisse	15
1 a Häufigkeit antimitochondrialer Antikörper in unserem Krankengut	15
1 b AMA-positive Fälle - Gesamtüber- sicht	16
1 c Quantitative Immunglobulin- bestimmungen	17
1 d Serumspiegel der alkalischen Phosphatase	18
1 e Positive Fälle in der KBR	18
2. Immunglobulinklassen-Zugehörigkeit von antimitochondrialen Antikörpern	19
2 a Verteilung der Immunglobuline bei AMA-positiven Seren	19
3. Vergleich des Nachweises von anti- mitochondrialen Antikörpern mit der indirekten und direkten Immunfluores- zenztechnik	20
3 a Indirekte Immunfluoreszenztechnik	20
3 b Vergleich der fluoreszenzhistolo- gischen Methoden Sandwich-Test und Monolayer	21
3 c Indirekter FITC-Test mit isoliertem, unmarkiertem IgG, inkubiert mit Misch-Konjugat und Anti-Human-IgG- FITC	22
4. Zur Frage der Spezies- und Organ- spezifität	22

IV.	Diskussion	24
V.	Zusammenfassung	31
VI.	Tabellarischer Anhang	34
VII.	Literatur	56

Lebenslauf

I. Einleitung

In Ergänzung zur Klinik und dem pathohistologischen Bild hat der Nachweis antimitochondrialer Antikörper (AMA) bei bestimmten autoimmunen Formen von Lebererkrankungen eine hohe diagnostische Bedeutung gewonnen.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Seren von Patienten mit z.B. primär biliärer Zirrhose einen Antikörper enthalten, der mit Leber- und Nierenhomogenat Komplement bindet (15,35).

Dieser Antikörper reagiert bei Verwendung der fluoreszierenden Antikörpertechnik mit mitochondrienreichen Zellen (19,27,50). Diese gegenüber der Komplementbindungsreaktion (KBR) sensitivere und spezifischere Methode zum Nachweis von Autoantikörpern erlaubte eine bessere Charakterisierung immunologischer Lebererkrankungen (50). Dabei wurden in unterschiedlichem Prozentsatz Autoantikörper gefunden bei primärer biliärer Zirrhose, chronisch aktiver Hepatitis und "kryptogener Zirrhose" (7,20). In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß diese Antikörper ausschließlich mit Mitochondrien reagieren (6). Das Antigen ist an den inneren Membranen der Mitochondrien lokalisiert und steht nicht in Zusammenhang mit den Enzymen der Atmungskette (9). Die äußere Membran ist nicht beteiligt (8). Es handelt sich bei dem, mit den Seren von Patienten mit primär biliärer Zirrhose reagierenden, Antigen um ein Lipoprotein, wobei zur Erhaltung der Antigenität Lipid und Protein notwendig sind (10). Die weiteren bisher charakterisierten Proteine der Mitochondrienstruktur sind nicht beteiligt. Das Antigen unterscheidet sich deutlich vom Cardiolipin, dem Diphospholipid der inneren

Membran, welches in der Luesserologie von Bedeutung ist. Ein mit der fluoreszierenden Antikörpertechnik bei sekundärer Syphilis und Patienten mit falsch positiven Wassermann-Reaktionen identifizierter Antikörper, der ein ähnliches Fluoreszenzmuster wie die AMA aufweist, ist gegen dieses Antigen gerichtet.

Bei einer Untergruppe von Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis wurde ein Antikörper beschrieben, der zwar in der Immunfluoreszenz den antimitochondrialen Antikörpern ähnelt, der aber gegen ein Antigen gerichtet ist, das assoziiert ist mit Ribosomen und den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, auch "liver-kidney antigen (LKM)" genannt (44). Dieser Patientenkreis grenzt sich dadurch von der Gruppe der chronisch aktiven Hepatitiden mit antimitochondrialen Antikörpern ab, da hier das Vorkommen bei beiden Geschlechtern fast gleich ist. Diese Patienten sind außerdem im Altersdurchschnitt jünger, und das Auftreten einer Cholestase steht nicht im Vordergrund (43). Ein weiterer Unterschied zu Patienten mit "autoimmuner" Hepatitis besteht darin, daß keine oder nur in geringem Ausmaß, Antikörper gegen Kerne oder glatte Muskulatur gefunden werden (4).

Antikörper gegen Mitochondrienantigene in hohen Titern wurden auch beim Pseudo-LE-Syndrom gefunden. Bei diesem Krankheitsbild fehlen die beim Lupus erythematoses disseminatus charakteristischerweise vorhandenen antinukleären Antikörper (39). Nach heutigem Kenntnisstand wird dieses Syndrom durch die Einnahme eines Venenpräparates (Venopyronum^R) ausgelöst (39).

Die Angaben über die Häufigkeit antimitochondrialer Antikörper bei autoimmunen Lebererkrankungen sind in der Literatur uneinheitlich: nach Befunden von DONIACH et al. haben 93 % der primär biliären Zirrhosen antimitochondriale

Antikörper. Bei chronisch aktiven Hepatitiden wurden AMA in 26 % und bei kryptogenen Zirrhosen in 28 % der Fälle positiv gefunden (21). Bei anderen Autoren wird die Häufigkeit von antimitochondrialen Antikörpern bei primär biliärer Zirrhose mit 94 %, bei chronisch aktiver Hepatitis mit 23 %, bei kryptogener Zirrhose mit 25 % angegeben (51). Im Gegensatz dazu fanden andere Untersucher antimitochondriale Antikörper bei primär biliärer Zirrhose nur in 79 % der Fälle (33).

Über das Vorkommen von antimitochondrialen Antikörpern bei verschiedenen nicht-hepatischen Krankheiten finden sich folgende Angaben: Lupus erythematoses 7 %, andere Kollagenkrankheiten 8 %, rheumatoide Arthritis 1,5 %, perniziöse Anämie und autoimmune Thyreoiditis zwischen 0,7 und 2 % (16).

Untersuchungen hinsichtlich der Zugehörigkeit von antimitochondrialen Antikörpern zu bestimmten Immunglobulinklassen und Korrelation zur Erhöhung bestimmter Serenparameter (Transaminasen etc.) liegen bisher nur in beschränktem Umfang vor. Die bisher vorliegenden Angaben über die Immunglobulinklassenzugehörigkeit weisen darauf hin, daß antimitochondriale Antikörper zu allen drei Hauptklassen der Immunglobuline (IgG, IgM, IgA) gehören (11,28).

Bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen sind IgG und IgM in der quantitativen Immunelektrophorese häufig hoch (25,33). Eine Korrelation zu den Veränderungen der biochemischen Parameter und der Dauer oder Schwere der Krankheit besteht nicht (19,25). Es findet sich auch keine Beziehung des AMA-Titers zum IgM-Spiegel des Serums (36).

Die mitochondrialen Antikörper, die bei Patienten mit falsch positiven Wassermann-Reaktionen beobachtet werden, konnten der IgM-Klasse zugeordnet werden (18). Bei Pseudo-LE-Fällen war die Antikörperaktivität nur in der IgG-Fraktion nachweisbar (19). Solch präzise Angaben liegen für antimitochondriale Antikörper bei autoimmunen Lebererkrankungen bisher nicht vor.

In den vergangenen Jahren wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, antimitochondriale Antikörper näher zu charakterisieren. Dies wurde einerseits durch Fortentwicklung spezieller Laboruntersuchungen (fluoreszierende Antikörpertechnik und Komplementbindungsreaktion), andererseits durch die Isolierung von Subfraktionen von Mitochondrien angestrebt. So gelang eine Differenzierung der antimitochondrialen Antikörper bei primär biliärer Zirrhose und bei Pseudo-LE durch die KBR, wobei Antigenfraktionen verwendet wurden, die durch die zonale Gradientenzentrifugation gewonnen wurden (5). Nach diesen Befunden reagieren die Pseudo-LE-Fälle ausschließlich mit der Gradientenfraktion im Dichtebereich 1,10, die Patienten mit autoimmuner Hepatitis mit der Dichtefraktion 1,19. Außerdem wurde eine Mischform beobachtet, die mit beiden Fraktionen reagiert: in dieser Gruppe treten aber auch gleichzeitig fluoreszenzserologisch antinukleäre Antikörper und Antikörper gegen glatte Muskulatur auf.

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigen sich an einem größeren Krankengut mit folgenden Fragestellungen:

1. Prozentuale Häufigkeit von antimitochondrialen Antikörpern in unserem Krankengut.
2. Immunglobulinklassenzugehörigkeit von antimitochondrialen Antikörpern.

3. Vergleich der Ergebnisse der fluoreszierenden Antikörpertechnik und der Komplementbindungsreaktion.
4. Bedeutung von nicht-komplementbindenden Antikörpern des IgM- oder IgA-Typs für eventuelle Unterschiede der FAT- oder KBR-Ergebnisse.
5. Vergleich des Nachweises von antimitochondrialen Antikörpern mit der direkten und indirekten Immunfluoreszenztechnik.
6. Organ- und Speziespezifität der antimitochondrialen Antikörper.

II. Material und Methoden

A. Patienten

Untersucht wurden 87 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen (Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) n = 26, chronisch aktive Hepatitis n = 61, davon autoimmune chronisch aktive Hepatitis n = 32, HB_sAg-positive chronisch aktive Hepatitis n = 29).

Weitergehende Untersuchungen wurden an 35 Patienten, die entweder AMA in der Immunhistologie oder der KBR zeigten und/oder histologisch die Diagnose einer primär biliären Zirrhose hatten, durchgeführt. (Primär biliäre Zirrhose n = 27, chronisch aktive Hepatitis n = 1, Zustand nach akuter Hepatitis n = 1, beginnender Umbau in Leberzirrhose n = 1, Pseudo-LE nach Einnahme von Venopyron n = 1, Pleuraerguß unklarer Genese n = 1, n = 3 zur Zeit bioptisch keine gesicherte Lebererkrankung nachweisbar).

B. Methoden

1. Fluoreszenzhistologie

1.1 Gewinnung von FITC-markiertem IgG

(FITC = Fluoresceinisothiocyanat)

Aus 17 Seren von Patienten, bei denen antimitochondriale Antikörper nachgewiesen wurden, wurde die IgG-Fraktion über folgende Schritte abgetrennt:

1.1.1 IgG-Isolierung (13)

- Umsalzen von 40 ml Serum durch Gelfiltration über eine Sephadex G 50 Säule, äquilibriert mit Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5.
- Chromatographische Abtrennung der IgG-Fraktion über DEAE-Cellulose, äquilibriert mit 0,01 M Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5.
- Einengen des Eluats über Amicon-Ultrafiltration auf ca. 10 ml und Einstellen auf 5,0 mg/ml Protein.
- Kontrolle
 - a) Reinheit: Immunelektrophorese mit Antihuman-Serum (Hyland)
 - b) AMA: indirekter FITC-Test
 - c) Proteinbestimmung nach Lowry

1.1.2 Kopplung mit FITC (3,14)

Ein Teil der IgG-Fraktion wurde unmarkiert à 0,5 ml bei -20°C eingefroren. Der Hauptanteil der IgG-Fraktion wurde mit FITC (1,7 %ig) unter ständigem Rühren (20 h, 4°C) gekoppelt. Dazu wurde das FITC vorher in 0,5 M Carbonat-Bicarbonat-Puffer pH 9,5 gelöst und tropfenweise der IgG-Lösung beigegeben.

1.1.3 Reinigung des Fluoreszenzkonjugates (2)

Der nicht gebundene freie Farbstoff wird durch Gelfiltration mit Sephadex G 50, äquilibriert mit Natrium-Phosphat-Puffer pH 6,2, entfernt.

Angeschlossen wurde das Präzipitationsreinigungsverfahren (2), das in Dialysieren der Konjugate gegen Natrium-Phosphat-Puffer besteht. Dadurch werden übermarkierte Konjugatanteile, die für eine unspezifische Fluoreszenz verantwortlich sind, eliminiert.

Danach wurden die Konjugate über eine Sephadex G 50 Säule mit Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,5 umgesalzen.

Der Proteingehalt der Konjugate wurde auf 5 mg/ml eingestellt. Die molare F/P-Rate lag zwischen 2,0 und 3,0. Berechnung nach Goldstein et al. 1961 (24). Die gereinigten Konjugate wurden bei -20°C in kleinen Portionen à 0,5 ml gelagert.

1.2 Isolierung von IgM

Aus 5 Seren, die antimitochondriale Antikörper enthielten, wurde die IgM-Fraktion abgetrennt.

1.2.1 Ammoniumsulfatfällung (13)

Fällung der Immunglobuline durch Ammoniumsulfat. Das so gewonnene Präzipitat wurde in Aqua destillata gelöst und gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Anschließend erfolgte eine Eiweißbestimmung und Einstellung des Proteingehaltes auf 15 mg/ml.

1.2.2 Chromatographische Abtrennung (13)

Der nächste Schritt bestand in einer Säulenchromatographie über Sephadex G 200 mit Tris-Puffer pH 8. Der erste Peak wurde gesammelt und in Dextran L 80 auf ca. 1 ml eingengt. Anschließend erfolgte eine Kontrolle mittels Immunelektrophorese. Die IgM-Lösung wurde auf 5 mg/ml eingestellt und in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren.

1.3 Direkter FITC-Test oder Monolayer (3,14)

Die FITC-Konjugate wurden auf Kryostat-Schnitte von 7 m_u Dicke gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBS-Puffer gewaschen und danach mit PBS-Glyzerin (1:1) eingedeckt.

1.4 Indirekter FITC-Test oder Sandwich-Technik (49)

Die Kryostat-Schnitte wurden für 30 min bei 37 °C mit Serum inkubiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C mit

- a) Mischkonjugat (fluorescein-markiertes Anti-Human-IgG, -A, -M),
- b) monospezifische Konjugate,
 Anti-Human-IgG-FITC
 Anti-Human-IgM-FITC
 Anti-Human-IgA-FITC (alle Konjugate von Behring)

Anschließend erfolgte eine dreimalige Waschung in PBS und Eindeckung mit PBS-Glycerin.

Der indirekte FITC-Test wurde außer mit Serum auch mit isoliertem, nicht markiertem IgG und isoliertem IgM ausgeführt. Die Inkubation erfolgte mit Misch-Konjugat und Anti-Human-IgG-FITC bzw. Anti-Human-IgM-FITC.

Als Substrate wurden Kryostatschnitte folgender Gewebe verwendet:

- a) Niere (Kaninchen),
- b) Niere (Ratte),
- c) Niere (Mensch),
- d) Schilddrüse (Schwein).

Fluoreszenzmikroskop:

Die Auswertung erfolgte mit dem Leitz-Orthoplan mit Orthomaten, Auflichtfluoreszenz mit Fluoreszenz-auflichtilluminator nach Ploem, Interferenz-Blaufilter KP 490, Dichromat-Teilerspiegel TK 510, Sperrfilter U 515, Selektionsfilter für FITC S 525.

2. Serologische Untersuchungen

2.1 Gewinnung von Mitochondrien-Antigenen aus Ratten- und menschlicher Leber

2.1.1 Differenzierte Ultrazentrifugation (1,37)

Bei mit Äther narkotisierten Ratten wurde die Leber vor der Entnahme mit Hanks-Lösung⁺ vom unterbundenen Pfortaderstumpf her perfundiert. Die Gewebe wurden nach Entfernung von möglichst vielen Bindegewebsanteilen unter Zusatz von 0,2 M Saccharose homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 2200 g zentrifugiert. Das Sediment (Kerne) wurde verworfen. Der Überstand wurde 10 min bei 19600 g zentrifugiert. Das Sediment (Mitochondrien) wurde durch dreimalige Zentrifugation von 10 min bei 19600 g gewaschen. Der Überstand (Mikrosomen und lösliches Protein) wurde verworfen. Die so gewonnenen Antigene wurden gefriergetrocknet. In der KBR wurde eine 0,1 %ige Lösung verwendet.

⁺Hanks-Lösung:

100 ml Hanks-Konzentrat (Difco), 900 ml Aqua dest. mit 3,5 ml oder mehr Natriumcarbonatlösung 8,4 %ig auf pH 7,2 - 7,5 eingestellt.

2.1.2 Reinigung über Succrose-Gradienten (23,40)

Es wurde ein Succrose-Dichte-Gradient hergestellt mit folgenden Dichtestufen: $d_{1,22}$, $d_{1,20}$, $d_{1,18}$, $d_{1,16}$. Darauf wurden die in obengenannter Methode gewonnenen Mitochondrien, suspendiert in 0,2 M Succrose-Lösung, gegeben und 75 min bei 100.000 g zentrifugiert. Verwendet wurde ein Beckman-Rotor, Typ 50 Ti.

Eine schmale Zone in den Grenzbereichen $d_{1,18}$, $d_{1,20}$, $d_{1,22}$ besteht aus Mitochondrien (38). Der Vorgang wurde mehrmals wiederholt und die gewonnene Antigensuspension lyophilisiert und in der KBR eingesetzt.

2.2 Komplementbindungsreaktion zum Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern (30)

Die durch differenzierte Ultrazentrifugation und über den Succrose-Gradienten gewonnenen Antigene wurden in der KBR (zunächst qualitativ, dann quantitativ) eingesetzt.

Vorversuch: Zur Ermittlung der im Hauptversuch einzusetzenden Komplementkonzentration wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe von Komplement (Meerschweinchenkomplement Behring) von 1:20 bis 1:200 aufgestellt. Der Vorversuch besteht aus einer Antigenreihe und einer Kontrollreihe (ohne Antigen). Es wurden jeweils 0,25 ml normales Humanserum (1:5 verdünnt, 30 min bei 56 °C inaktiviert), Antigen (ursprünglich 0,025 %ige Lösung, 1:20 verdünnt in 0,2 ml Saccharose-Lösung) und Ery-Ambozeptor (= 1 ml Hammelerythrozyten und 0,1 ml Ambozeptor, beides Behring, ad 100 ml physiologischer NaCl-Lösung) zusammengegeben und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Ablesung: niedrigste gerade noch lysierende Komplementmenge = 1 KE.

Komplementgebrauchsdosis: 2 KE (Komplementeinheiten).

Hauptversuch: Es wurden 0,25 ml des 1:5 verdünnten und inaktivierten Patientenserums und 0,25 ml der Antigenverdünnung zusammengegeben. Anschließend wurden 0,25 ml Komplement in ermittelter Konzentration zugegeben. Danach erfolgte Inkubation über 2 Std. bei Zimmertemperatur, über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C und 15 min bei 37 °C im Wasserbad. Erst dann wurden 0,25 ml Ery-Ambozeptor zugesetzt und es erfolgte Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 15 min. Auch im Hauptversuch wurde eine Kontrollreihe (ohne Antigen) mitgeführt.

Die Seren mit positivem Ergebnis wurden verdünnt und nach neuen Vorversuchen erneut im Hauptversuch eingesetzt.

2.3 KBR mit Cardiolipin (31)

Ambozeptorvorversuch: Es wurde von einer Ambozeptorstammlösung (1:100) eine Verdünnungsreihe aufgestellt (1:1000 bis 1:8000). Zu je 0,5 ml Ambozeptorverdünnungslösung wurden 0,3 ml des 1:30 verdünnten Komplements und 1,7 ml Kolmer-Lösung⁺ und 0,2 ml Hammelblut-Suspension gegeben und die Röhrchen geschüttelt. Sie kamen für 30 min bei 37 °C ins Wasserbad.

Ablesung: 1 Ambozeptoreinheit ist die höchste Ambozeptorverdünnung, die noch komplette Lyse zeigt.

⁺Kolmer-Lösung: 0,85 %ige NaCl-Lösung, welcher pro Liter Lösung (im Kühlschrank aufzubewahren) zugesetzt wird: 10 g MgCl₂ x 6 H₂O und 4 g CaCl x 2 H₂O in 100 ml Aqua dest.

Ambozeptorgebrauchsverdünnung: 2 Ambozeptoreinheiten.

Das hämolytische System wurde hergestellt durch Mischung gleicher Mengen Ambozeptorgebrauchsverdünnung und Hammelblut-Suspension und anschließendem Erwärmen von 30 min auf 37 °C.

Komplementvorversuch: Zunächst wurden eine Cardiolipin-Antigen-Verdünnung 1:120 durch Zusammengeben von 1 ml Antigen (Behring) und 119 ml Kolmer-Lösung und eine Komplementverdünnung 1:30 hergestellt. Dann wurden in ein Röhrchen 0,2 ml Komplementverdünnung gegeben. In den folgenden Röhrchen wurde diese Menge jeweils um 0,05 ml erhöht. Dann wurden jeweils 0,5 ml Antigenverdünnung zugegeben. Daran anschließend wurde die Kolmer-Lösung zugefügt: in Röhrchen Nr. 1 und 2 jeweils 1,3 ml, in Röhrchen Nr. 3 und 4 jeweils 1,2 ml, in Röhrchen Nr. 5 und 6 jeweils 1,1 ml und in Röhrchen Nr. 7 1,00 ml. Danach kam der Ansatz eine Stunde zur Bindung ins Wasserbad bei 37 °C. Erst dann wurden jeweils 1,0 ml des hämolytischen Systems zugefügt. Anschließend erfolgte die Lyse eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Auch bei diesem Vorversuch lief eine Kontrolle ohne Antigen mit.

Ablesung: Niedrigste, eben noch lysierende Komplementmenge = 1 Komplementeinheit. Diese KE + 0,05 ml ergibt die korrigierte KE.

Gebrauchsdosis: 2 korrigierte KE.

Hauptversuch: Das Patientenserum wurde 30 min bei 37 °C inaktiviert und auf 1:2,5 mit Kolmer-Lösung verdünnt. Zusammengegeben wurden: 0,3 ml Kolmer-Lösung, 0,2 ml Patientenserum, 0,5 ml Antigenverdünnung 1:120. Der Ansatz blieb 15 min bei Zimmertemperatur stehen. Danach wurden 1,0 ml der Komplementverdünnung zugegeben. Die Röhrchen wurden geschüttelt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Sie kamen dann ins Wasserbad (37°C) für 15 min. Zuletzt wurde das hämolytische System zugefügt. Die Lyse erfolgte bei 37°C für 15 min im Wasserbad. Anschließend Ablesung. Auch beim Hauptversuch wurde eine Kontrollreihe mitgeführt.

III. Ergebnisse

1.a Häufigkeit antimitochondrialer Antikörper in unserem Krankengut

Bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose und chronisch aktiver Hepatitis wurde das Auftreten von antimitochondrialen Antikörpern untersucht. Außerdem wurde das Auftreten von Antikörpern gegen Kerne und glatte Muskulatur berücksichtigt. Der Nachweis der Autoantikörper erfolgte im indirekten FITC-Test.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:
In den Seren von Patienten mit primär biliärer Zirrhose wurden in 18 von 26 Fällen antimitochondriale Antikörper gefunden (rel. Häufigkeit 0,69). Antinukleäre Faktoren konnten in 6 von 26 Fällen nachgewiesen werden (rel. Häufigkeit 0,23), während sich in 10 von 26 Fällen SMA fanden (rel. Häufigkeit 0,38).

Bei 8 von 61 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis fanden sich im Serum antimitochondriale Antikörper (rel. Häufigkeit 0,1). ANF konnten in dieser Gruppe bei 19 von 61 Fällen nachgewiesen werden (rel. Häufigkeit 0,30), während der Nachweis von SMA in 6 von 61 Fällen erbracht werden konnte (rel. Häufigkeit 0,09).

In der Gruppe der "autoimmunen" chronisch aktiven Hepatiden wurden in 5 von 32 Fällen antimitochondriale Antikörper nachgewiesen (rel. Häufigkeit 0,15). In 13 von 32 Fällen wurden ANF gefunden (rel. Häufigkeit 0,46), in 4 von 32 Fällen fanden sich SMA (rel. Häufigkeit 0,12).

Bei den Patienten mit HB_s-Ag-positiver Hepatitis hatten 3 von 29 Fällen antimitochondriale Antikörper (rel. Häufig-

keit 0,1). Antinukleäre Faktoren wurden in 6 von 29 Fällen nachgewiesen (rel. Häufigkeit 0,2), SMA fanden sich in 2 von 29 Fällen (rel. Häufigkeit 0,06).

1.b AMA-positive Fälle - Gesamtübersicht

Eine Übersicht über die eingehender untersuchten Patienten, ihre Diagnosen, klinischen Daten und die Ergebnisse aus der fluoreszierenden Antikörpertechnik und der KBR sind in den Tabellen 2 a bis c und 3 a-c gegeben.

Die Tabellen 2 a-c zeigen:

An biochemischen Parametern sind die Ergebnisse aus der quantitativen Immunglobulinbestimmung, Bilirubin, alkalische Phosphatase und Cholesterin angegeben.

Die Tabellen 3 a-c zeigen:

In der FAT wurden außer den AMA auch antinukleäre Faktoren und Antikörper gegen glatte Muskulatur bestimmt. Bei der KBR wurden die Ergebnisse mit den vier Antigenen aufgeführt: Mitochondrien aus menschlicher Leber (H) und zusätzlich über Succrose-Gradienten gereinigte Mitochondrien (HG), Mitochondrien aus Rattenleber (R) und zusätzlich über Succrose-Gradienten gereinigte Mitochondrien (RG).

Die Diagnosen der Patienten mit primär biliärer Zirrhose und akuter bzw. chronisch aktiver Hepatitis waren histologisch gesichert.

Die Korrelationen der Ergebnisse aus fluoreszierender Antikörpertechnik und Komplementbindungsreaktion sind in Tabelle 4 aufgeführt.

In der FAT wurden antimitochondriale Antikörper in 27 von 35 Fällen nachgewiesen. In der KBR waren 18 von 35 Fällen AMA-positiv. Ein positiver Nachweis von AMA in beiden Methoden gelang in 13 von 35 Fällen. Nur in der FAT positiv waren 14 von 35 Fällen, nur in der KBR positiv waren 5 von 25 Fällen. Bemerkenswert ist, daß bei 32 von 37 Fällen AMA in beiden oder einer von beiden Methoden nachgewiesen werden konnten. Nur bei 3 von 35 Patienten wurden keine AMA nachgewiesen, obgleich bei diesen Patienten histologisch eine primär biliäre Zirrhose bestand.

1.c Quantitative Immunglobulinbestimmungen

IgG war im Serum bei 15 von 35 Patienten erhöht. Bei den Patienten, die im FAT und KBR AMA-positiv waren, war IgG in 7 von 13 Fällen erhöht. Eine IgG-Erhöhung im Serum fand sich bei 4 von 14 Patienten, bei denen AMA nur in der FAT nachgewiesen waren. Bei den Patienten, die nur in der KBR AMA-positiv waren, war IgG in 4 von 5 Fällen im Serum erhöht.

Eine Erhöhung von IgM im Serum fand sich in 18 von 35 Fällen. Bei den Patienten, die in beiden Methoden, KBR und FAT, AMA aufwiesen, war IgM in 6 von 13 Fällen im Serum erhöht. Bei den nur in der FAT AMA-positiven Patienten ergab sich eine Erhöhung von IgM im Serum in 8 von 14 Fällen. Bei den Patienten, bei denen AMA nur in der KBR nachgewiesen waren, war in 4 von 5 Fällen IgM im Serum erhöht.

IgA war im Serum bei 3 von 35 Fällen erhöht. Davon gehören zwei in die Gruppe der Patienten mit antimitochondrialen Antikörpern, die in der KBR und fluoreszenz-

histologisch positiv waren. In einem Fall waren nur fluoreszenzmikroskopisch AMA nachweisbar, nicht jedoch in der KBR.

1.d Serumspiegel der alkalischen Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde bei 28 von 35 Patienten bestimmt. (Normalwert 60 bis 170 mU/ml). Der Wert war in 21 von 28 Fällen erhöht. Davon ergab sich bei den Patienten, bei denen antimitochondriale Antikörper sowohl in der FAT als auch in der KBR nachgewiesen worden waren, in 7 von 13 Fällen eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase. In der Gruppe, die AMA nur in der FAT zeigte, war die alkalische Phosphatase in 9 von 14 Fällen erhöht. Bei den Patienten, bei denen AMA nur in der KBR nachweisbar war, war die alkalische Phosphatase in 3 von 5 Fällen erhöht. Bei den 3 Patienten, die im Serum keine AMA aufwiesen, war in 2 Fällen die alkalische Phosphatase erhöht.

In 5 von 28 Fällen war gleichzeitig Cholesterin im Serum erhöht.

1.e Positive Ergebnisse in der KBR

In 18 von 35 getesteten Seren war die Reaktion mit humanen Mitochondrien in der KBR positiv.

Beim Einsatz von Mitochondrien aus Rattenleber ergab die KBR in 6 von 24 Fällen ein positives Ergebnis.

Die Reaktion mit Cardiolipin war in allen Fällen negativ.

2. Immunglobulinklassen-Zugehörigkeit von anti-mitochondrialen Antikörpern

2.a Verteilung der Immunglobuline bei AMA-positiven Seren

Die Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation des Immunglobulinspiegels zum Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern sind in Tabelle 5-7 zusammengefaßt:

Bei 27 untersuchten Seren war in 11 Fällen der IgG-Spiegel erhöht. 7 von 11 Seren mit erhöhtem IgG-Spiegel zählen zur Gruppe der Patienten mit antimitochondrialen Antikörpern in FAT und KBR. Bei den Patienten, die antimitochondriale Antikörper nur in der KBR zeigten, war IgG in 4 von 5 Fällen erhöht. Bei den Seren, die antimitochondriale Antikörper nur in der FAT hatten, war IgG in 4 von 14 Fällen erhöht.

Von 27 untersuchten Fällen wiesen 13 einen erhöhten IgM-Spiegel auf. Bei 3 Seren bewegte sich der Wert an der oberen Normgrenze. Bei 13 Patienten, die AMA sowohl in der fluoreszierenden Antikörpertechnik, als auch in der KBR hatten, war der IgM-Spiegel in 6 Fällen erhöht. In 8 von 14 Fällen war IgM im Serum erhöht bei Patienten, bei denen AMA nur in der FAT nachgewiesen waren. IgM war in 4 von 5 Fällen im Serum erhöht bei Patienten, die nur in der KBR antimitochondriale Antikörper aufwiesen.

IgA war in der Gruppe der KBR- und FAT-positiven Seren in 2 von 13 Fällen im Serum erhöht. In der Gruppe, die antimitochondriale Antikörper nur in der FAT zeigten, war in einem von 14 Fällen IgA erhöht.

3. Vergleich des Nachweises von antimitochondrialen Antikörpern mit der indirekten und direkten Immunfluoreszenztechnik

Üblicherweise wird zum Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern nur die indirekte Immunfluoreszenztechnik angewendet. Um eventuelle, durch unspezifische Bindung verursachte, falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurde bei diesen Untersuchungen die indirekte Immunfluoreszenztechnik (S) mit der direkten Fluoreszenztechnik (M) verglichen.

3.a Indirekte Immunfluoreszenz

In dieser Versuchsreihe wurden folgende verschiedene Fluoreszenz-Konjugate verwendet:

- a) Misch-Konjugat (Anti-Human-IgG/A/M-FITC)
- b) Anti-Human-IgG-FITC
- c) Anti-Human-IgM-FITC
- d) Anti-Human-IgA-FITC

Die verwendeten Seren wurden 1:5 verdünnt.

Die Beurteilung der Fluoreszenzintensität erfolgt nach folgender Abstufung:

- Ø - negativ
- +
- ++ - stark positiv
- +++ - sehr stark positiv

In Tabelle 8 a-d sind die Ergebnisse zusammengefaßt:

Bei Verwendung von Mischkonjugat und Anti-Human-IgG-FITC ist die Beurteilung im immunhistologischen Bild nahezu gleich. Alle 17 AMA-positiven Seren zeigen positive Reaktion mit Anti-Human-IgG-FITC. Fällt die Bewertung der Schnitte, die mit Anti-Human-IgG-FITC inkubiert wurden, schwächer aus, findet man positive Ergebnisse in der Gruppe, die mit Anti-Human-IgM- oder IgA-FITC inkubiert wurden.

Nur in 3 von 17 Fällen werden keine Antikörper vom IgM-Typ nachgewiesen. Die Beurteilung fällt fast durchweg schwächer aus als bei der Inkubation mit Antihuman-IgG-FITC. Die Ausnahmen bilden Nr. 7, 8, 13 und 17, insbesondere bei Verwendung von Gewebsschnitten menschlicher Nieren.

Bei Inkubation mit Anti-Human-IgA-FITC sind in 6 von 17 Fällen die Ergebnisse auf allen verwendeten Geweben negativ. Auch hier fällt die Beurteilung durchwegs schwächer aus, als bei der Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC.

3.b Vergleich der fluoreszenzhistologischen Methoden Sandwich-Test (S) - Monolayer (M)

Aus den Tabellen 9 a und b ist zu ersehen, daß bei den 17 Seren, die in beiden Methoden getestet wurden, die Monolayer-Technik in den meisten Fällen (12 von 17) um eine Stufe schwächer beurteilt wird. In 5 von 17 Fällen fällt die Beurteilung gleich stark wie in der Sandwich-Technik aus (Nr. 6, 8, 13, 14, 17). Dies mag mit der relativ hohen F/P-Rate dieser Konjugate zusammenhängen. Die verschiedenen Gewebe verhalten sich in dieser Hinsicht gleich.

3.c Indirekter FITC-Test mit isoliertem, unmarkiertem IgG, inkubiert mit Misch-Konjugat und Anti-Human-IgG-FITC

Tabelle 10 a und b zeigten folgende Ergebnisse:

Bei Gebrauch von isoliertem unmarkiertem IgG in der indirekten Fluoreszenztechnik verhalten sich die Fluoreszenzmuster annähernd gleich wie bei Verwendung der Sandwich-Technik mit Serum (vergl. Tab. 7 a-d). Die größten Abweichungen fallen bei Verwendung von Schweine-Schilddrüse auf. In 6 von 17 Fällen ist der FITC-Test auf diesem Gewebe negativ. Bei Nr. 1 und 2 dagegen ist das Fluoreszenzmuster deutlich stärker als bei der Inkubation mit Serum.

Beim Sandwich mit isoliertem, nicht markiertem IgG wird die Fluoreszenz bei Anwendung von Mischkonjugat bzw. Anti-Human-IgG-FITC annähernd gleich beurteilt. In einigen Fällen ist das Muster unter Verwendung von Anti-Human-IgG-FITC etwas schwächer.

4. Zur Frage der Spezies- und Organspezifität

Nach der Inkubation mit Anti-Human-IgG-FITC im Sandwich-Test wird praktisch in allen Fällen eine Fluoreszenz nachgewiesen. Besonders stark ist das Fluoreszenzmuster bei Verwendung von Kaninchen- und Ratten-Niere, etwas schwächer auf menschlicher Niere und Schilddrüse vom Schwein. Eine Spezifität für ein bestimmtes Organ besteht nicht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Bei der Verwendung von Anti-Human-IgM-FITC werden weniger positive Ergebnisse erzielt. Am stärksten ist die Fluoreszenz bei Verwendung von humaner Niere und Schilddrüse vom Schwein. Von einer Spezies- oder Organspezifität kann

auch hier nicht gesprochen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 b zusammengefaßt.

Die wenigsten positiven Ergebnisse ergeben sich bei der Anwendung von Anti-Human-IgA-FITC, wobei das Fluoreszenzmuster auch nicht besonders stark ausgeprägt ist. Bei Inkubation auf humaner Niere wird nur in 4 Fällen einfach bzw. schwach positiv gewertet. Eine Spezies- oder Organspezifität kann auch hier nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 c zusammengefaßt.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine weitere Charakterisierung antimitochondrialer Antikörper auf Serum- und Gewebsebene vorgenommen. Die vorliegenden Untersuchungen haben dabei folgende Hauptergebnisse gebracht:

Die Angaben über die Häufigkeit von Autoantikörpern bei autoimmunen Lebererkrankungen in der Literatur differieren zum Teil zu den Beobachtungen in unserem Krankengut:

Das Auftreten von antimitochondrialen Antikörpern bei primär biliärer Zirrhose wird angegeben im Bereich von 79 - 93 % (27,33,51), während sie in unseren Untersuchungen in 18 von 26 Fällen auftreten, was einer relativen Häufigkeit von 0,69 entspricht. Faßt man jedoch die Ergebnisse aus KBR und FAT zusammen, so kommt man in einen ähnlichen Bereich. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen möglicherweise auf der unterschiedlichen Spezifität der verwendeten Konjugate.

Bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis schwanken die Angaben zwischen 23 und 26 %, was sich mit unseren Untersuchungen nicht deckt (nur in 8 von 61 Fällen, entspricht einer relativen Häufigkeit von 0,1).

Antinukleäre Faktoren finden PARONETTO et al. (1967) bei 19 von 53 Patienten, DONIACH et al. (1966) bei 19 von 41 Fällen. ANF werden bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose in 6 von 26 Fällen in unseren Untersuchungen gefunden. Dieses Ergebnis kommt den Angaben von DONIACH und WALKER (1972) nahe, wo ein Prozentsatz von 24 % aufgeführt wird (17).

Bei chronisch aktiver Hepatitis treten ANF bei uns in 19 von 61 Fällen auf. Bei PARONETTO et al. (1967) und DONIACH (1966) liegen die Angaben mit 8 von 15 bzw. 33 von 44 Fällen höher.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß bei den Untersuchungen auf SMA bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose das Verhältnis von positivem Ergebnis zur Zahl der untersuchten Fälle bei 10 zu 26 liegt, bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis mit 6 zu 61 angegeben werden kann. Bei DONIACH et al. (1966) liegt die Angabe für das Kollektiv mit primär biliärer Zirrhose bei 20 zu 40, bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis bei 26 zu 39. WHITTINGHAM et al. (1966) geben bei 21 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis 10 positive Tests auf SMA an.

Zusammenfassende Tabelle über die Häufigkeit von Autoantikörpern, Angaben verschiedener Autoren.

- a) bei primär biliärer Zirrhose
- b) bei chronisch aktiver Hepatitis

a) primär biliäre Zirrhose:

	DONIACH et al. (27) (1966)	WALKER et al. (51)	PARONETTO et al. (33) (1967)	WHITTING- HAM et al. (50) (1966)	DONIACH, D. (17) (1972)
AMA	42/45 (93%)	88/49 (94%)	42/53 (79%)	6/6	96/100
ANF	19/41		19/53	4/6	24/100
SMA	20/40			0/6	49/100

b) chronisch aktive Hepatitis:

	DONIACH et al. (27) (1966)	WALKER et al. (51)	PARONETTO et al. (33) (1967)	WHITTINGHAM et al. (50) (1966)	DONIACH, D. (17) (1972)
AMA	11/42 (26%)	14/60 (23%)	12/15	0/53	
ANF	33/43		8/15	12/21	
SMA	26/39			10/21	

Es wurde vermutet, daß diese unterschiedlichen Ergebnisse in bezug auf das Vorkommen von Autoantikörpern bei Lebererkrankungen auf Unterschiede in der Labor-technik zurückzuführen sind (26).

Über leberspezifische Antikörper bei chronischen Lebererkrankungen wurde bereits von anderen Stellen berichtet (32,38). Verschiedene Autoren zeigten jedoch, daß anti-mitochondriale Antikörper weder spezies- noch organspezifisch sind (19,27,42).

Die vorliegenden Untersuchungen an Geweben verschiedener Spezies und Organe bestätigen diese Befunde, bzw. unterstreichen sie sogar, da auch die Monolayer-Technik angewendet wurde, die unspezifische Bindung der Konjugate weitgehend ausschließt.

Es konnte bei dem von uns untersuchten Patientengut keine Korrelation aufgezeigt werden zwischen Höhe des Immunglobulinspiegels im Serum und dem Titer der antimitochondrialen Antikörper. Diese Beobachtung stimmt überein mit anderen Arbeiten, wo zwar ein erhöhter Immunglobulinspiegel bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose beschrieben wird, besonders bei IgM (36,39), aber ein

Zusammenhang zum Titer der Antikörper gegen Mitochondrien oder zur Dauer oder Schwere der Erkrankung nicht gezeigt werden konnte (29,36). Es besteht weiterhin auch keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer Cholestase und den Ergebnissen in KBR und FAT.

Der gleichzeitige Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern mit der Immunfluoreszenztechnik und mit der Komplementbindungsreaktion erlaubte eine Einteilung der untersuchten Patienten in vier Gruppen. Dabei standen in 35 untersuchten Fällen 26 positive Ergebnisse in der Fluoreszenzserologie 18 positiven Ergebnissen in der KBR gegenüber. In drei Fällen waren beide Tests auf antimitochondriale Antikörper negativ, obwohl histologisch eine primär biliäre Zirrhose bestand. Bemerkenswert war, daß weder mit der FAT noch mit der KBR alle AMA-positiven Fälle erfaßt wurden. Erst die Anwendung beider Methoden erlaubt eine weitgehende Beurteilung eines AMA-positiven Befundes.

Bei der Verteilung von IgG und IgM in den verschiedenen Gruppen ergeben sich keine eindeutigen Korrelationen. Die IgG- und IgM-Spiegel verhalten sich etwa gleich. Auffällig ist nur, daß in Gruppe 2 (fluoreszenzserologischer Nachweis positiv - KBR negativ) der IgM-Spiegel in 8 von 13 Fällen positiv ist, der IgG-Spiegel nur in 4 von 13 Fällen.

Die 18 positiven Ergebnisse in der KBR ergeben sich bei der Verwendung von einfach gereinigtem humanem Antigen. Bei Einsatz von zusätzlich gereinigtem humanem Antigen bleiben nur drei positive Reaktionen, wohingegen mit Ratten-Antigen nur sechs positive Ergebnisse erzielt werden. Wahrscheinlich stehen die negativen Reaktionen mit dem Verlust der Antigenität bei der Präparation in Verbindung.

Die Reaktion mit Cardiolipin war in allen Fällen negativ.

Aus der Verteilung der Immunglobuline bei KBR-positiven bzw. FITC-Test-positiven Seren lassen sich keine eindeutigen Beziehungen ablesen.

Im indirekten FITC-Test (Sandwich) wurden verschiedene Konjugate verwendet (Mischkonjugat, Anti-Human-IgG-, Anti-Human-IgA-, Anti-Human-IgM-Konjugat). Dabei fällt die Beurteilung im Vergleich zur Anwendung von Mischkonjugat mit Anti-Human-IgG-FITC gleich, mit Anti-Human-IgA- und Anti-Human-IgM-FITC schwächer aus.

Bei allen Inkubationen besteht keine Korrelation zwischen der Stärke des Fluoreszenzmusters zum Serum-Ig-Spiegel oder dem Ergebnis in der KBR.

Beim Vergleich der fluoreszenzhistologischen Methoden Sandwich - Monolayer, werden die Ergebnisse im Monolayer zwar schwächer beurteilt, die Zahl der positiven Ergebnisse bleibt aber gleich. Falsch positive Ergebnisse durch unspezifische Bindungen scheiden somit aus.

Bei Ausführung eines Sandwich-Testes mit unmarkiertem IgG und Inkubation mit Mischkonjugat und Anti-Human-IgG-FITC ergaben sich keine Unterschiede im Fluoreszenzmuster, die Ergebnisse zeigen auch kaum Unterschiede zur Inkubation mit Vollserum. Die Ergebnisse beweisen somit, daß es sich um eine spezifische Bindung handelt.

Alle Inkubationen der Fluoreszenzserologie wurden mit Kryostatschnitten vier verschiedener Gewebe durchgeführt: menschliche Niere, Kaninchen- und Rattenniere, sowie Schilddrüse vom Schwein.

Die in der Fluoreszenzhistologie durchgeführten Sandwichtests mit verschiedenen monospezifischen Konjugaten bestätigen die Untersuchungen anderer Autoren (17), daß antimitochondriale Antikörper in allen drei Hauptklassen der Immunglobuline auftreten. Es fällt allerdings auf, daß bei den oben beschriebenen Ergebnissen das Fluoreszenzmuster mit Anti-Human-IgA und Anti-Human-IgM weniger ausgeprägt ist. An anderer Stelle wird bereits beschrieben, daß die IgA-Fluoreszenz gewöhnlicherweise schwächer ausfällt (10).

Bei unseren Untersuchungen konnte in keiner der drei Immunglobulinklassen eine Spezies- oder Organspezifität nachgewiesen werden.

Wie weitere Untersuchungen gezeigt haben (19), ergeben sich beim Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern mit der fluoreszierenden Antikörpertechnik mehr positive Ergebnisse als in der KBR. Ein negatives Ergebnis in beiden Testsystemen schließt jedoch eine autoimmune Lebererkrankung nicht aus, wie es bereits auch schon von anderer Seite beschrieben wurde (16).

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde trotz Anwendung verschiedener Nachweismethoden und Fluoreszenztechniken eine Organ- und/oder Speziespezifität nicht nachgewiesen. Angaben hierzu liegen in der Literatur nicht vor.

Die hier durchgeführten Untersuchungen haben jedoch sichergestellt, daß antimitochondriale Antikörper in allen drei Immunglobulinklassen auftreten.

Beim Vergleich der serologischen Nachweismethoden konnten die untersuchten Patienten in vier Gruppen eingeordnet werden. Keine der Gruppen zeigt eine Korrelation zu einer bestimmten Immunglobulinklasse, so daß die unter-

schiedlichen Ergebnisse in der fluoreszierenden Antikörpertechnik und Komplementbindungsreaktion nicht durch nicht-komplementbindende Antikörper vom IgM-Typ oder IgA-Typ erklärt werden können, wie eingangs angedeutet.

Bei den Nachweismethoden erwies sich der FITC-Test als treffsicherer, was in der Routinediagnostik von Bedeutung ist. Allerdings ist bemerkenswert, daß erst durch die Hinzunahme der Komplementbindungsreaktion die Gesamtzahl der AMA-positiven Fälle erfaßt wird.

Die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Immunglobulin-klasse für antimitochondriale Antikörper konnte nicht bestätigt werden. Es konnte erneut gezeigt werden, daß antimitochondriale Antikörper spezies- und organunspezifisch sind.

Unabhängig von den hier vorgelegten Befunden ist die Rolle der antimitochondrialen Antikörper als diagnostischer Parameter unbestritten.

Eine eventuelle Bedeutung bei der Pathogenese autoimmuner Lebererkrankungen bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

V. Zusammenfassung

Untersucht wurden aus unserem Krankengut 87 Patienten auf Vorkommen von Autoantikörpern mittels fluoreszierender Antikörpertechnik. Eingehender untersucht wurden 35 Patienten, die antimitochondriale Antikörper in der fluoreszierenden Antikörpertechnik oder der Komplementbindungsreaktion aufwiesen und/oder die Diagnose einer primär biliären Zirrhose hatten. Es wurden klinische Parameter und quantitative Immunglobulin-Bestimmungen herangezogen.

Bei 17 Seren wurde die Immunglobulin-Fraktion isoliert und mit FITC konjugiert.

Die Untersuchungen haben folgende Ergebnisse erbracht:

1. Die Häufigkeit von antimitochondrialen Antikörpern bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose liegt in unserem Krankengut bei 18 von 26 Fällen (rel. Häufigkeit 0,69). Bei Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis wiesen 8 von 61 Fällen antimitochondriale Antikörper auf (rel. Häufigkeit 0,1).
2. Die Zugehörigkeit von antimitochondrialen Antikörpern wurde mit verschiedenen Fluoreszenz-techniken untersucht. Wie die Ergebnisse zeigen gehören die antimitochondrialen Antikörper allen drei Hauptklassen der Immunglobuline an.
3. Beim Vergleich der fluoreszenzserologischen Methoden Sandwich - Monolayer werden die Ergebnisse im Monolayer zwar schwächer beurteilt, aber die Zahl der positiven Fälle bleibt gleich. Unspezifische Bindungen, und damit falsch positive Ergebnisse, konnten somit ausgeschlossen werden.

4. Beim Vergleich der serologischen Nachweismethoden von antimitochondrialen Antikörpern waren in der fluoreszierenden Antikörpertechnik 27 von 35 Fällen positiv, in der KBR 17 von 35 Fällen. Bei Anwendung beider Methoden ergaben sich bei 35 Fällen 32 positive Ergebnisse. Nur bei 3 Patienten mit primär biliärer Zirrhose waren beide Untersuchungen auf AMA negativ.

Keine der Gruppen zeigte eine Korrelation zu einer bestimmten Immunglobulinklasse oder zum Auftreten einer Cholestase.

Zusammenfassend lassen sich die eingangs aufgeworfenen Fragestellungen wie folgt beantworten:

1. Die Häufigkeit von antimitochondrialen Antikörpern in unserem Krankengut liegt bei Patienten mit primär biliärer Zirrhose bei 18 von 26 Fällen, bei chronisch aktiver Hepatitis bei 8 von 61 Fällen.
2. Antimitochondriale Antikörper gehören allen drei Hauptklassen der Immunglobuline an.
3. Bei der Untersuchung auf antimitochondriale Antikörper erweist sich die fluoreszierende Antikörpertechnik als treffsicherer gegenüber der Komplementbindungsreaktion. Alle positiven Befunde erfaßt man jedoch nur bei der Anwendung beider Methoden.
4. Im Vergleich der direkten und der indirekten fluoreszierenden Antikörpertechnik ergaben sich keine Hinweise auf eine möglicherweise unspezifische Bindung von antimitochondrialen Antikörpern an Gewebssubstrat.

5. Die unterschiedlichen Ergebnisse in der fluoreszierenden Antikörpertechnik und der KBR können nicht durch nicht-komplementbindende Antikörper vom IgM- oder IgA-Typ erklärt werden.

Tabelle 1: Häufigkeit von Autoantikörpern bei primär biliärer Zirrhose und chronisch aktiver Hepatitis in unserem Krankengut.

	AMA		ANF		SMA	
primär biliäre Zirrhose n = 26	18/26	0,69	6/26	0,23	10/26	0,38
chron. aktive Hepatitis (CAH) gesamt n=61	8/61	0,1	19/61	0,30	6/61	0,09
autoimm. CAH n=32	5/32	0,15	13/32	0,46	4/32	0,12
HB _s AG pos. CAH n=29	3/29	0,10	6/29	0,20	2/29	0,06

Tabelle 2a: Patienten, klinische Daten

	Pat.	Diagnose	IgG (mg/100ml)	IgM (mg/100ml)	IgA (mg/100ml)	Bili. (mg/100ml)	a.P. (mU/ml)	Chol. (mg %)
1	K.W.	p.b.Z.	1460	300	140	1,2	1518	465
2	S.M.	p.b.Z.	500	279	58	11,8	450	288
3	B.M.	p.b.Z.	830	1020	42	2,2	549	412
4	S.A.	p.b.Z.	1460	190	370	n.b.	n.b.	236
5	S.H.	p.b.Z.	1100	43	88	0,6	946	237
6	B.H.	V. a. beginn p.b.Z.	1000	379	250	0,4	70	256
7	M.M.	p.b.Z.	1240	310	100	1,4	1107	287
8	H.A.	p.b.Z.	1000	650	90	n.b.	1734	148
9	Sp.A	p.b.Z.	1520	460	356	n.b.	n.b.	324
10	H.L.	p.b.Z.	960	326	58	0,3	364	278
11	J.H.	CAH	7680	3930	335	0,2	80	n.b.
12	S.K.	p.b.Z.	4160	424	604	2,4	420	256
13	F.P.	p.b.Z.	800	115	86	n.b.	419	243

Tabelle 2b: Patienten, klinische Daten

	Pat.	Diagnose	IgG (mg/100ml)	IgM (mg/100ml)	IgA (mg/100ml)	Bili. (mg/100ml)	a. P. (mU/ml)	Chol. (mg %)
14	B.I.	Pseudo-LE	2050	148	147	n.b.	69	241
15	S.E.	Lk.-Schwellig. unkl. Genese	2500	170	634	0,3	73	244
16	B.M.	unklar	1240	166	325	7,5	991	163
17	V.B.	p.b.Z.	2200	96	120	2,1	270	324
18	R.A.	p.b.Z.	1680	400	350	0,5	836	215
19	B.A.	p.b.Z.	200	714	316	7,9	507	150
20	C.A.	p.b.Z.	2100	244	84	0,2	n.b.	85
21	H.E.	p.b.Z.	880	310	210	n.b.	n.b.	141
22	H.D.	Chron.destr. Cholangitis	2200	3100	350	n.b.	277	121
23	M.M.	akt. intrahep. Cholangitis	1200	186	295	4,0	704	307
24	S.H.	p.b.Z.	2600	480	300	n.b.	325	205
25	K.I.	p.b.Z.	2300	380	530	0,1	768	150
26	K.B.	p.b.Z.	2100	988	84	n.b.	n.b.	n.b.

	Pat.	Diagnose	IgG (mg/100ml)	IgM (mg/100ml)	IgA (mg/100ml)	Bili. (mg/100ml)	a. P. (mU/ml)	Chol. (mg%)
27	H.M.	beginn. Umbau in Leberzirrh	1900	280	80	0,5	487	233
28	W.I.	p.b.Z.	2200	130	70	n.b.	n.b.	n.b.
29	Sc.M.	Z.n.akt.Hep.	2140	572	235	0,7	93	32
30	L.J.	p.b.Z.	1200	190	350	16,8	720	183
31	Sch. A.	unklar	517	60	107	0,2	130	212
32	S.I.	p.b.Z.	940	395	122	21	1200	290
33	Se. I.	Pleuraerguß	2100	280	104	n.b.	n.b.	27
34	L.A.	p.b.Z.	2100	290	100	2,9	1520	393
35	R.E.	p.b.Z.	1200	180	320	2,8	126	35

Tabelle 3a: Patienten-Ergebnisse in FAT und KBR

	Pat.	Diagnose	FAT			KBR auf AMA				
			ANF	SMA	AMA	H	Hg	R	Rg	Cardio- lipin
1	K.W.	p.b.Z.	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
2	S.M.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
3	B.M.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
4	S.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	⁺⁺ 1:10	Ø	Ø
5	S.H.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
6	M.M.	V. a. Beginn. p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
7	H.A.	p.b.Z.	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
8	W.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
9	Sp.A.	p.b.Z.	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
10	H.L.	p.b.Z.	+	+	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
11	J.H.	c.a.H.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
12	S.K.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	⁺⁺⁺ 1:20	Ø	Ø	Ø	Ø

Tabelle 3b: Patienten-Ergebnisse in FAT und KBR

	Pat.	Diagnose	FAT			KBR auf AMA				
			ANF	SMA	AMA	H	Hg	R	Rg	Cardiolipin
13	F.P.	p.b.Z.	Ø	+	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
14	B.I.	Pseudo-LE	Ø	+	+	1:5 ⁺	Ø	Ø	Ø	Ø
15	S.E.	Lk-Schwellg. unkl. Genese	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
16	B.M.	unklar, evtl. Z.n.cek.Hep.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
17	V.B.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
18	R.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
19	B.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	1:5 ⁺	1:5 ⁺	1:5 ⁺	1:5 ⁺	Ø
20	C.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	1:10 ⁺⁺	1:5 ⁺	1:40 ⁺⁺⁺	1:40 ⁺⁺⁺	Ø
21	H.E.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	1:5 ⁺	Ø	Ø	Ø	Ø
22	H.D.	chron.destr. Cholangitis	+	+	Ø	1:5 ⁺	1:5 ⁺	1:5 ⁺	1:5 ⁺	Ø
23	M.M.	akt.intrahep. Cholangitis	+	+	+	1:5 ⁺	Ø	Ø	1:5 ⁺	Ø
24	S.H.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	1:5 ⁺	Ø	1:5 ⁺	1:5 ⁺	Ø

Tabelle 3c: Patienten-Ergebnisse in FAT und KBR

	Pat.	Diagnose	FAT			KBR auf AMA					Cardio- lipin
			ANF	SMA	AMA	H	Hg	R	Rg		
25	K.I.	p.b.Z.	+	+	Ø	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø	
26	K.B.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø	
27	H.M.	beginn. Umbau in Leci	Ø	Ø	+	⁺⁺ 1:10	Ø	⁺ 1:5	Ø	Ø	
28	W.L.	p.b.Z.	+	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø	
29	Sc.M.	Z.n.ak.Hep.	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	⁺ 1:5	Ø	
30	L.J.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
31	Sch. A.	unklar	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø	
32	S.I.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
33	Se.I.	Pleuraerguß	Ø	Ø	+	⁺ 1:5	Ø	Ø	Ø	Ø	
34	L.A.	p.b.Z.	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
35	R.E.	p.b.Z.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Tabelle 4:

Vierfeldertest

n = 35	FAT positiv	FAT negativ
KBR positiv	Gruppe 1 13 rel. Häufigk. 0,37	Gruppe 3 5 rel. Häufigk. 0,14
KBR negativ	Gruppe 2 14 rel. Häufigk. 0,40	Gruppe 4 3 rel. Häufigk. 0,08

Tabelle 5: Verteilung von IgG in den verschiedenen Gruppen



Abelle 6: Verteilung von IgM in den verschiedenen Gruppen

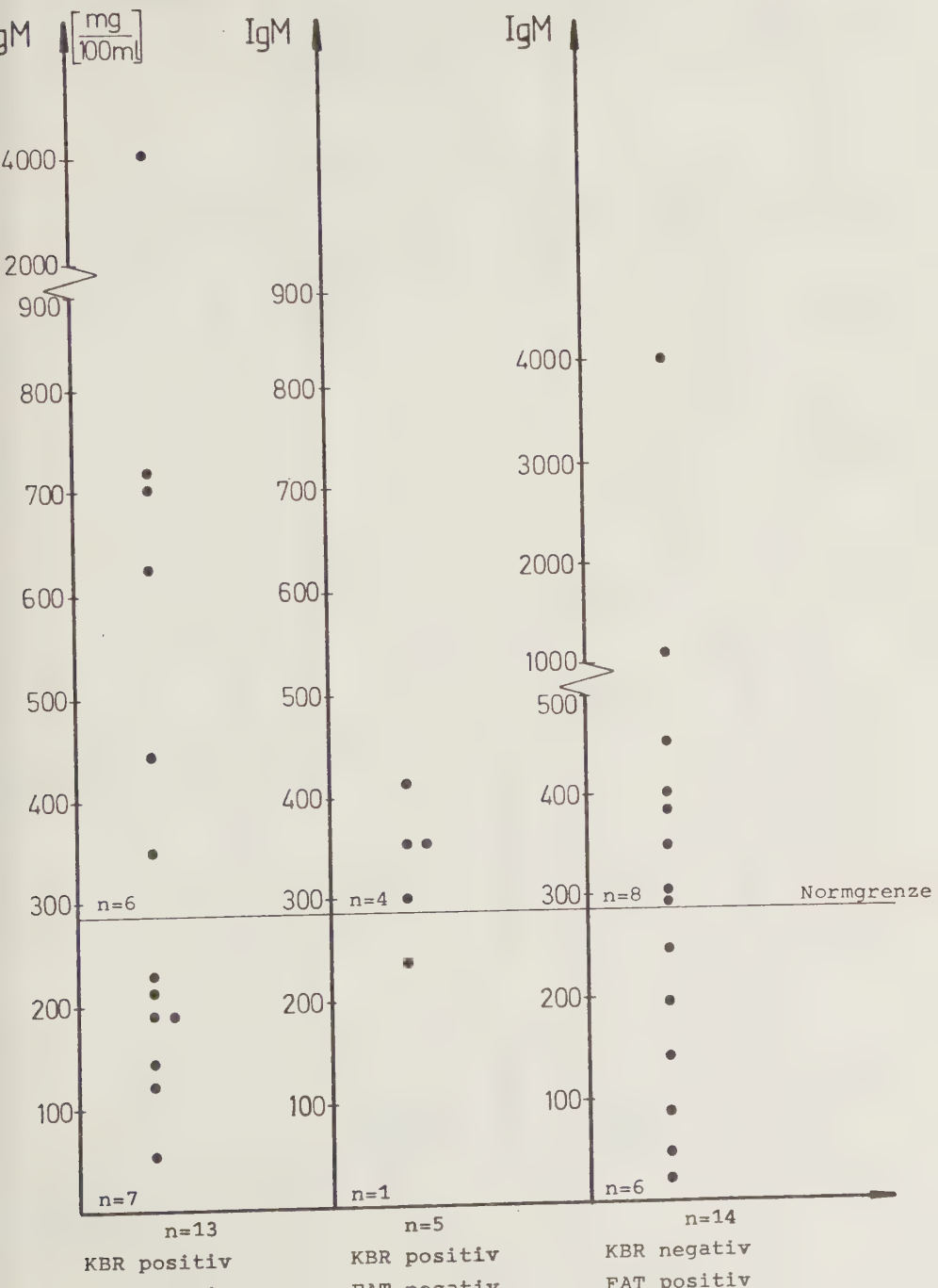


Tabelle 7: Verteilung der Immunglobuline bei FAT-positiven Seren (n=27)

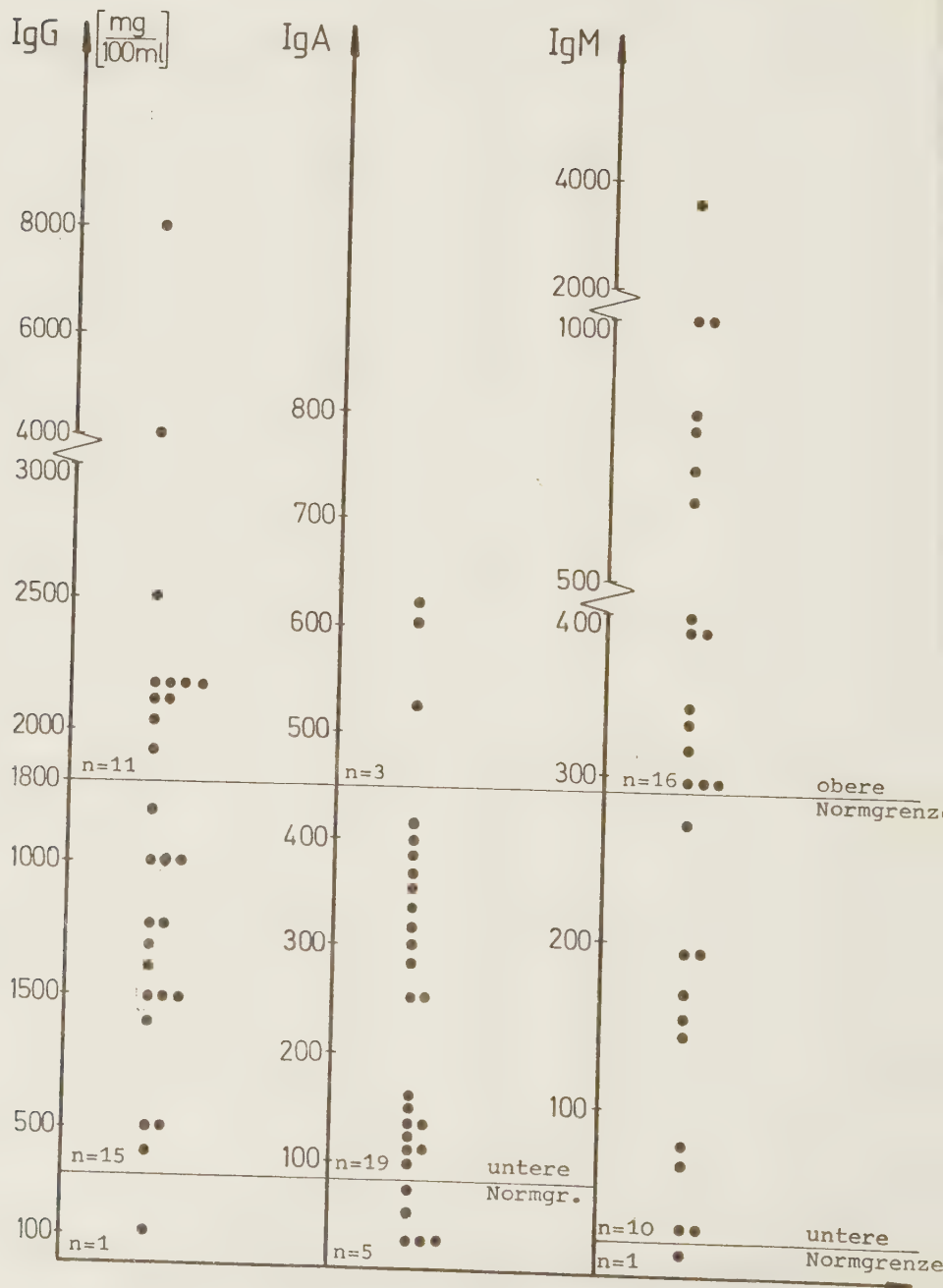


Tabelle 8a: Indirekte Fluoreszenzmethode -
Inkubation der verschiedenen Gewebssubstrate
mit Mischkonjugat (a),
Anti-H-IgG-FITC (b),
Anti-H-IgM-FITC (c) und
Anti-H-IgA-FITC (d)

	I	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
1	a	++	++	++	+
	b	++	++	++	+
	c	∅	∅	∅	∅
	d	∅	∅	∅	∅
2	a	++	++	+	(+)
	b	++	++	+	(+)
	c	(+)	(+)	∅	∅
	d	∅	∅	∅	∅
3	a	+	++	+	+
	b	++	++	+	+
	c	∅	∅	∅	∅
	d	∅	∅	∅	∅
4	a	++	++	+	+
	b	++	++	+	∅
	c	∅	∅	+	+
	d	(+)	(+)	∅	(+)
5	a	++	++	+	+
	b	++	∅	+	+
	c	∅	(+)	(+)	(+)
	d	+	(+)	∅	∅

Tabelle 8b: Indirekte Fluoreszenzmethode -
Inkubation der verschiedenen Gewebssubstrate
mit Mischkonjugat (a),
Anti-H-IgG-FITC (b),
Anti-H-IgM-FITC (c) und
Anti-H-IgA-FITC (d)

	I	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
6	a	++	++	+	+
	b	++	++	+	+
	c	(+)	∅	(+)	∅
	d	(+)	∅	(+)	∅
7	a	++	++	+ - ++	+
	b	++	+	+	+
	c	(+)	(+)	++	++
	d	(+)	(+)	∅	(+)
8	a	++	++ - +++	++	++
	b	+ - ++	++	+	+
	c	∅	+	++	++
	d	∅	∅	∅	∅
9	a	+++	++	++	++
	b	+++	++	++	+
	c	(+)	+	∅	+
	d	+	(+)	∅	(+)
10	a	++	++	+ - ++	+
	b	++	++	+ - ++	+
	c	+	(+)	∅	+
	d	+	∅	(+)	(+)

Tabelle 8c: Indirekte Fluoreszenzmethode -
 Inkubation der verschiedenen Gewebssubstrate
 mit Mischkonjugat (a),
 Anti-H-IgG-FITC (b),
 Anti-H-IgM-FITC (c) und
 Anti-H-IgA-FITC (d)

	I	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
11	a	++	++	++	(+)
	b	++	+	++	(+)
	c	∅	∅	∅ - +	+
	d	∅	∅	∅	(+)
12	a	++	+++	++	+
	b	++	+ - ++	++	(+)
	c	(+)	(+)	+	(+)
	d	∅	(+)	∅	∅
13	a	++	++	++	(+)
	b	++	++	+	(+)
	c	+	(+)	+ - ++	(+)
	d	+	+	∅	(+)
14	a	++	++	++	+
	b	++	++	++	+
	c	∅	∅	∅	∅
	d	∅	∅	∅	∅
15	a	+	+	+	+
	b	+	+	(+)	+
	c	∅	∅	+	(+)
	d	∅	∅	+	∅

Tabelle 8d: Indirekte Fluoreszenzmethode -
Inkubation der verschiedenen Gewebssubstrate
mit Mischkonjugat (a),
Anti-H-IgG-FITC (b),
Anti-H-IgM-FITC (c) und
Anti-H-IgA-FITC (d)

	I	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
16	a	+ - ++	++	+	+
	b	+ - ++	++	+	(+)
	c	∅	∅	(+)	(+)
	d	∅	∅	∅	∅
17	a	++	+	++	+++
	b	++	++	++	+
	c	(+)	∅	+ - ++	+++
	d	(+)	(+)	∅ - (+)	∅

Tabelle 9a: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse in der direkten (Monolayer - M) und der indirekten (Sandwich - S) Fluoreszenzmethode.

	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Technik	mol. F/P-Rate
1	++	++	+	S	1,9
	+ - ++	+	+	M	
2	++	++	+	S	2,06
	+	∅ - (+)	+	M	
3	+	+	+	S	1,9
	+ - ++	++	++	M	
4	++	++	+	S	3,4
	+	+	+	M	
5	++	++	+	S	1,5
	+	+	+	M	
6	++	++	+	S	3,0
	++	++	++	M	
7	++	++	+ - ++	S	3,2
	(+)	(+)	(+)	M	
8	++	++ - +++	++	S	3,15
	++	++	++	M	
9	+++	++	++	S	2,7
	+ - ++	+	+	M	

Tabelle 9b: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse in der direkten (Monolayer - M) und der indirekten (Sandwich - S) Fluoreszenzmethode.

	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Technik	mol. F/P-Rate
10	++	++	+ - ++	S	2,1
	+	+	+	M	
11	++	++	++	S	2,8
	+	+	+	M	
12	++	+++	++	S	2,6
	++	++	++	M	
13	++	++	++	S	3,7
	++	++	++	M	
14	++	++	++	S	2,1
	++	++	++	M	
15	+	+	+	S	3,15
	(+)	(+)	(+)	M	
16	++	++	+	S	2,9
	+	+	+	M	
17	++	+	++	S	3,0
	++	++	++	M	

Tabelle 10a: Indirekter FITC-Test mit isoliertem, unmarkiertem IgG, inkubiert mit Mischkonjugat (A) und Anti-Human-IgG-FITC (B)

	Konjugat	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
1	A	++	++	++	++
	B	++	++	++	(+)
2	A	+ - ++	++	++	+
	B	++	+++	++	+
3	A	+ - ++	+ - ++	++	+
	B	++	++	+	(+)
4	A	+	+	(+)	+
	B	(+)	(+)	(+)	(+)
5	A	+	+	(+)	+
	B	(+)	(+)	(+)	(+)
6	A	++ - +++	+++	++	+ - ++
	B	+ - ++	++	++	+
7	A	++	+++	+ - ++	++
	B	+	+++	++	+
8	A	++	+++	+ - ++	++
	B	+	+++	++	+
9	A	+++	+++	++	++
	B	+++	+++	++	++
10	A	++	+++	(++)	++
	B	+	+++	++	+

Tabelle 10b: Indirekter FITC-Test mit isoliertem, unmarkiertem IgG, inkubiert mit Misch-Konjugat (A) und Anti-Human-IgG-FITC (B)

	Konjugat	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Schilddr. Schwein
11	A	++	+ - ++	+	+ - ++
	B	+	++	+	∅
12	A	++	++	++	(+)
	B	+ - ++	++	++	∅
13	A	++	++	++	∅
	B	+ - ++	++	++	∅
14	A	++	+	+	+
	B	+	++	++	+++
15	A	(+)	+ - ++	+	+
	B	∅	+	+	∅
16	A	++	+ - ++	+	++
	B	++	+	++	∅
17	A	+ - ++	++	+	++
	B	+	+	+	∅

Tabelle 11a: Indirekter FITC-Test mit
Anti-Human-IgM-FITC

	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Serum- IgM-Spiegel (mg/100ml)
1	∅	∅	∅	300
2	(+)	(+)	∅	280
3	∅	∅	∅	1020
4	∅	∅	+	190
5	∅	(+)	(+)	43
6	(+)	∅	(+)	379
7	(+)	(+)	++	310
8	∅	+	++	650
9	(+)	+	∅	460
10	+	(+)	∅	326
11	∅	∅	∅ - (+)	3903
12	(+)	(+)	+	424
13	+	(+)	+ - ++	115
14	∅	∅	∅	148
15	∅	∅	+	170
16	∅	∅	(+)	160
17	(+)	∅	+ - ++	96

Tabelle 11b: Indirekter FITC-Test mit
Anti-Human-IgG-FITC

	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Serum- IgG-Spiegel (mg/100ml)
1	++	++	++	1460
2	++	++	+	500
3	++	++	+	830
4	++	++	+	1460
5	++	∅	+	1100
6	++	++	+	1000
7	++	+	+	1240
8	+ - ++	++	+	1000
9	+++	++	++	1520
10	++	++	+ - ++	960
11	++	+	++	7680
12	++	+ - ++	++	4160
13	++	++	+	800
14	++	++	++	2050
15	+	+	(+)	2500
16	+ - ++	++	+	1240
17	++	++	++	2200

Tabelle 11c: Indirekter FITC-Test mit
Anti-Human-IgA-FITC

	Niere Kaninchen	Niere Ratte	Niere Human	Serum- IgA-Spiegel (mg/100ml)
1	∅	∅	∅	140
2	∅	∅	∅	58
3	∅	∅	∅	42
4	(+)	(+)	∅	370
5	+	(+)	∅	88
6	(+)	∅	(+)	250
7	(+)	(+)	∅	100
8	∅	∅	∅	90
9	+	(+)	∅	356
10	+	∅	(+)	58
11	∅	∅	∅	335
12	∅	(+)	∅	470
13	+	+	∅	604
14	∅	∅	∅	86
15	∅	∅	+	147
16	∅	∅	∅	634
17	(+)	(+)	∅ - (+)	325

IV. Literatur

1. APPELMANS, F. and C. DE DUVE:
Tissue fractionation studies: 3. Further observations
on the binding acid phosphatase by rat-liver particles.
Biochem. J. 59, 426 (1955)
2. ARNOLD, W. and H. v. MAYERSBACH:
Changes in the solubility of immunoglobulins after
fluorescein labeling and its influence on immuno-
fluorescence techniques.
J. Histochem. Cytochem. 20, 975 (1972)
3. BERG, P.A.:
Humorale Autoimmunphänomene bei Lebererkrankungen.
Ztschr. f. Gastroent. 13, 257 (1975)
4. BERG, P.A., T. BINDER:
Demonstration of mitochondrial Antibodies from patients
with chronic liver diseases reacting with two different
types of complement-fixing-antigens.
Minerva Gastroenterol. 22, 3, 185 (1976)
5. BERG, P.A., T. BINDER, H. LINDNER u.a.:
Heterogenität mitochondrialer Antikörper.
Dtsch. med. Wschr. 100, 1123 (1975)
6. BERG, P.A., DONIACH, D. and I.M. ROITT:
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis.
I. Localization of the antigen to mitochondrial membranes.
J. Exp. Med. 126, 277 (1967)
7. BERG, P.A., D. DONIACH and I.M. ROITT:
Immunologische Probleme bei Leberkrankheiten:
Die Bedeutung mitochondrialer Antikörper.
Klin. Wschr. 24, 1297 (1969)

8. BERG, P.A., R.W. HORNE, I.M. ROITT and D. DONIACH:
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis:
II. The complement fixing antigen as a component of
mitochondrial inner membrane.
Brit. J. exp. Path. 50, 200 (1969)
9. BERG, P.A., I.M. ROITT, D. DONIACH and R.W. HORNE:
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis:
III. Characterization of the inner membrane complement
fixing antigen.
Clin. Exp. Immunol. 4, 511 (1969)
10. BERG, P.A., I.M. ROITT, D. DONIACH and H.M. COOPER:
Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis:
IV. Significance of the membrane structure for the
complement fixing antigen.
Immunology 17, 281 (1969)
11. BERG, P.A., M. TRAUNECKER und A. MÄRKER:
Mitochondriale Antikörper bei nicht hepatischen
Krankheiten.
Dtsch. Med. Wschr. 98, 1186 (1973)
12. BERG, P.A., T. BINDER, H. LINDNER, H. BANNASKI,
D. MAAS, H. HENNING, H. BÜGEL:
Heterogenität mitochondrialer Antikörper.
Dtsch. med. Wschr. 100, 1123 (1975)
13. CAMPBELL, D., H., J.S. GARVEY, D.H. SUSSDORF:
Methods in Immunology.
Sec. Edition, W.A. Benjamin Inc. N.Y. 1976,
pp 104-110, pp. 189-191
14. COONS, A.H. and M. KAPLAN:
Localization of antigen in tissue cells.
II. Improvements in a method for the deduction of antigen
by means of fluorescent antibody.
J. Immunol. 45, 159 (1950)

15. DEICHER, H.R.G., H.R. HOLMAN and H.G. KUNKEL:
Anticytoplasmic factors in the sera of patients with
systemic lupus erythematosus and certain other diseases.
Arthritis. Rheum. 3, 1 (1960)
16. DONIACH, D.:
The concept of an 'Autoallergic' Hepatitis.
Proc. Roy. Soc. Med. 63, 527 (1970)
17. DONIACH, D.:
Autoimmune aspects of liver disease.
Brit. med. Bull. 28, 145 (1972)
18. DONIACH, D., J. DELHANTY, H.J. LINDQUIST and R.D. CATTERALL:
Mitochondrial and other tissue autoantibodies in patients
with biological false positive reactions for syphilis.
Clin. Exp. Immunol. 6, 871 (1970)
19. DONIACH, D., I.M. ROITT, J.G. WALKER and S. SHERLOCK:
Tissue antibodies in primary biliary cirrhosis,
active chronic (lupoid) hepatitis, cryptogenic cirrhosis
and other diseases and their clinical implications.
Clin. Exp. Immunol. 1, 237 (1966)
20. DONIACH, D. and J.G. WALKER:
A unified concept of autoimmune hepatitis.
Lancet 1, 813 (1969)
21. DONIACH, D., J.G. WALKER and I.M. ROITT:
The significance of mitochondrial antibodies in liver
disease.
Acta Gastroent. Belg. 3, 399 (1970)
22. DONIACH, D. and J.G. WALKER:
Immunopathology of Liver Disease.
In: Progress in Liver Diseases, Vol. IV, pp. 381-402
edited by H. Popper and F. Schaffner
Grune and Stratton, New York, (1972)

23. DONIACH, D. and J.G. WALKER:
Mitochondrial antibodies.
Gut 15, 664 (1974)

24. EMMELOT, P., C.J. BOS, E.L. BENEDETTI and P. RÜMKE:
Studies on plasma membranes: I. Chemical composition
and enzyme content of plasma membranes isolated from
rat liver.
Biochem. Biophys. Acta 90, 126 (1964)

25. FEIZI, T.:
Immunoglobulins in chronic liver disease.
Gut 9, 193 (1968)

26. GOLDSTEIN, G., T.S. SLIZYS and M.W. CHASE:
Studies on fluorescent antibody staining.
I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled
sheep anti-rabbit globulins.
J. Exp. Med. 114, 89 (1961)

27. GOUDIE, R.B., R.N.M. MACSWEEN and D.M. GOLDBERG:
Serological and histological diagnosis of primary
biliary cirrhosis.
J. Clin. Path. 19, 527 (1966)

28. HADZIYANNIS, S.T., A. MOUSSOVROS and D. KARAMOUTZOS:
A comparative study of immunoglobulins, tissue anti-
bodies and immunoglobulin-containing cells in the liver.
Gut 12, 770 (1971)

29. HADZIYANNIS, ST., P.J. SCHEUER, T. FEIZI et al.:
Immunologic and histological studies in primary biliary
cirrhosis.
J. Clin. Path. 23, 95 (1970)

30. HALLMAN, L. und F. BURKHARDT:
Klinische Mikrobiologie.
G. Thieme Verlag Stuttgart, pp. 442-550 (1974)

31. HALLMAN, L. und F. BURKHARDT:
Klinische Mikrobiologie.
G. Thieme Verlag Stuttgart, pp. 461-467 (1974)
32. HIRAYAMA, C. and T. TODA:
Hepatic antigen in sera from patients with primary
biliary cirrhosis.
Nature (London) 212, 1061 (1968)
33. HOBBS, J.R.:
Serum proteins in liver disease.
Proc. Roy. Soc. Med. 60, 1250 (1967)
34. MAAS, D. und H. SCHUBOTHE:
Ein Lupus erythematoses ähnliches Syndrom mit anti-
mitochondrialen Antikörpern.
Dtsch. Med. Wschr. 98, 131 (1973)
35. MACKAY, I.R. and L. LARKIN:
The significance of the presence in human serum of
complement fixing antibodies to human tissue antigens.
Aust. Ann. Med. 7, 251 (1958)
36. MACSWEEN, R.N.M., C.H.W. HORNE, A.J. MOFFAT et al.:
Serum protein levels in primary biliary cirrhosis.
J. Clin. Path. 25, 789 (1972)
37. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.H.:
Über die immunbiologische Spezifität des Leberparenchyms.
Experimentelle und klinische Untersuchungen.
Habil.-Schrift Mainz, 1967
38. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.H.:
Klinische Untersuchungen zur immunologischen Spezifität
des Leberparenchyms.
Dtsch. Arch. Klin. Med. 215, 107 (1968)

39. MÜLLER-SCHOOP, J.W., P.J. GROB, H.J. JOLLER-JEMELKA et al.:
Pseudolupus: eine schwere Nebenwirkung eines Venenpräparates?
Schweiz. med. Wschr. 105, 603 (1975)
40. NEVILLE, D.M.:
The isolation of a cell membrane fraction from rat-liver.
J. Biophys. Biochem. Cytolog. 8, 413 (1960)
41. PARONETTO, F.:
Antibodies to cytoplasmic antigens in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis.
J. Lab. Clin. Med. 69, 979 (1967)
42. PARONETTO, F., F. SCHAFFNER, D.D. MUTTER et al.:
Circulating antibodies to bile ductular cells in various liver diseases.
J. Amer. med. Ass. 187, 503 (1964)
43. RIZETTO, M., F. BIANCHI und D. DONIACH:
Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis.
Immunol. 26, 589 (1974)
44. RIZETTO, M., G. SWANA and D. DONIACH:
Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other diseases.
Clin. Exp. Immunol. 15, 331 (1973)
45. SMITH, M.G.M., R. WILLIAMS, J.G. WALKER et al.:
Hepatic disorders associated with liver-kidney microsomal (LKM) antibodies.
Brit. med. J. 2, 80 (1974)
46. SOBER, H. and E. PETERSON:
An autoimmune reaction against human tissue antigens in certain acute and chronic diseases.
Fed. Proc. 17, 1116-1120 (1958)

47. WALKER, J.G., D. DONIACH, I.M. ROITT and S. SHERLOCK:
Immune studies in liver disease.
Proc. XIX. Sympos. Coloston Res. Soc. Bristol 19, 83 (1967)
48. WALKER, J.G., D. DONIACH, I.M. ROITT and S. SHERLOCK:
Serological tests on primary biliary cirrhosis.
Lancet 1, 827 (1965)
49. WELLER, T.H. and A.H. COONS:
Fluorescent antibody studies with reagents of varicella and
Herpes zoster propagated in vitro.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 86, 789 (1954)
50. WHITTINGHAM, S., J. IRWIN, I.R. MACKAY and M. SMALLEY:
Smooth muscle autoantibody in "Autoimmune" hepatitis.
Gastroenterology 51, 499 (1966)
51. WRIGHT, D.J. and D. DONIACH:
Recent advances in the immunology of syphilis.
Proc. Roy. Soc. Med. 64, 419 (1971)

Am Schluß meiner Arbeit möchte ich nicht versäumen,
Herrn Professor Dr. med. vet. Dr. med. Meyer zum
Büschengefeld für die Überlassung des Themas und
Herrn Professor Dr. med. W. Arnold für die stets
gütige Unterstützung meinen Dank auszusprechen.

Lebenslauf

Am 10.10.1950 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Hans Emil Will und seiner Ehefrau Christine, geb. Schollmeyer in Mainz geboren.

Nach fünfjähriger Grundschulzeit in Gimbsheim, Krs. Worms, besuchte ich das Staatliche Eleonorengymnasium in Worms, wo ich im Juni 1970 die Reifeprüfung bestand. Im gleichen Jahr konnte ich das Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz aufnehmen. Am 1. Juli 1976 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich in Stuttgart an der Inneren Abteilung des Katharinenhospitals, der Chirurgischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses und der Kinderklinik Olgahospital.

Die Approbation als Arzt erhielt ich im Oktober 1977.

Nach der Medizinalassistentenzeit war ich als Assistentin am Anästhesie-Institut des Paracelsuskrankenhauses in Ruit beschäftigt. Seit dem 1.1.1978 bin ich Assistentin an der Kinderklinik Olgahospital in Stuttgart mit dem Ziel, die Anerkennung als Facharzt für Kinderheilkunde zu erlangen.

